

学校编码: 10384  
学号: 24520071152530

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕士学位论文

# 新型组织工程皮肤支架材料的研究

Studies On New  
Scaffolds For Skin Tissue Engineering

李秀富

指导教师姓名: 张其清 教授/博导  
孙亚楠 讲师

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2010 年 5 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        )2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

## 摘要

大面积烧伤病人及皮肤病患者的临床治疗对皮肤组织的需求一直很大,但是临床上能够获得的供体皮肤组织十分有限。用组织工程学的方法制备人工皮肤替代物是解决皮源不足问题的有效途径。组织工程皮肤是利用生命科学与工程科学的原理和方法,研究和开发具有修复或改善受损人体皮肤功能的临床替代物。

本研究应用组织工程学的原理和方法,从大鼠皮肤中分离出成纤维细胞和角质细胞;用 I 型牛肌腱胶原,壳聚糖以及精氨酸制备出适于组织工程皮肤构建的精氨酸—胶原—壳聚糖海绵支架;将成纤维细胞种植在该支架上构建了人工真皮替代物;在人工真皮替代物基础上种植角质细胞构建双层人工皮肤。本文主要研究结果如下:

1. 用 DispaseII-胰蛋白酶联合消化法进行 SD 大鼠皮肤成纤维细胞和角质细胞的分离和培养,获得的成纤维细胞和角质细胞增殖能力强、生物性状稳定,可以用于构建组织工程皮肤。

2. 用胃蛋白酶消化法提取了牛肌腱胶原蛋白,用傅立叶红外分析表明,提取的胶原样品主要是 I 型胶原。以精氨酸、胶原和壳聚糖为原料,EDC 和 NHS 为交联剂,采用冷冻干燥法分别制备了胶原—壳聚糖和精氨酸—胶原—壳聚糖海绵支架。支架材料的扫描电镜结果显示,支架内部为交错网状结构,支架孔径大小均一,孔隙率良好,能为细胞生长提供所需要的微环境。将支架材料浸入模拟体液中,pH 值稳定在 7.3-7.45 之间,与人体内环境 pH 一致。红外图谱表明,精氨酸已经连接到支架上面。精氨酸—胶原—壳聚糖支架材料拉伸强度比胶原—壳聚糖支架材料拉伸强度高,精氨酸的加入提高了胶原—壳聚糖支架的力学强度。MTT 结果表明,经精氨酸交联后的支架材料明显比未经精氨酸交联的支架材料更能有效的促进细胞增殖。精氨酸—胶原—壳聚糖支架材料更适合作为皮肤组织工程用支架材料。

3. 将成纤维细胞种植于精氨酸—胶原—壳聚糖组织工程支架上并进行联合培养,利用 MTT、扫描电镜(SEM)、DAPI 染色、HE 染色、流式细胞技术等实验方法对支架中成纤维细胞的生长特性和生物学活性进行检测。实验结果均表

明，成纤维细胞在精氨酸-胶原-壳聚糖支架材料上可以良好地黏附和增殖。在体外构建出了具有一定功能活性的人工真皮替代物。

4. 在人工真皮替代物的基础上种植角质细胞，构建双层人工皮肤。HE 染色表明，复合培养 3 天表皮细胞生长良好，细胞形成集落，中间杂有成纤维细胞。

本实验构建的活性人工皮肤具有良好的理化性能和生物相容性，可以作为人工皮肤替代物用于皮肤缺损的修复。

**关键词：**成纤维细胞 角质细胞 精氨酸 组织工程 皮肤

## ABSTRACT

The demands for skin tissue in clinical treatment to the patients with large area skin injuries or disease always were large, but the supply of the skin was limited. The technique of skin tissue engineering has been a suitable method to provide skin equivalents to solve the problem of skin inadequacy. Tissue engineering utilizes the principles and methods of life science and engineering science, to research and develop the new clinical substitute for human skin.

According to tissue engineering's principles and methods, we isolated fibroblasts and keratinocytes from SD rat skin and fabricated arginine-collagen-chitosan scaffolds. The fibroblasts were transplanted into the sponge scaffolds to construct the tissue engineered dermal substitutes *in vitro*, and then the keratinocytes were transplanted onto dermal substitutes to construct the bilayered artificial skin. The main results of the research were as follows:

1. Fibroblasts and keratinocytes were successfully isolated from SD rat's skin with Dispase II-Trypsin digestion. The fibroblasts and keratinocytes were suitable for tissue engineering skin construction research as their strong proliferation ability and stable biological characteristics.
2. We extracted collagen from bovine tendon by Pepsin and acetic acid, with infrared (IR) method showing that the collagen extracted were mainly type I collagen. The arginine-collagen-chitosan and the collagen-chitosan scaffolds were fabricated with arginine, type I collagen and chitosan by freeze-drying and then cross-linked with 1 - (3 - dimethylamino-propyl) -3 - ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) /N-hydroxysuccinimide (NHS). The SEM showed that the scaffolds had interconnected pore structure, average pore size between 100  $\mu\text{m}$ -200  $\mu\text{m}$ , porosity >90 %, and water absorption >4000 %, which was enough for tissue scaffolds. The scaffolds were immersed in simulated body fluid, of which the pH were stable at between 7.3-7.45, and were consistent with the human internal environment. IR spectra showed that arginine has been connected to the scaffolds.

The tensile strength of arginine - collagen - chitosan scaffolds was higher than collagen - chitosan scaffolds, showing that the addition of arginine increasing the mechanical strength of scaffolds. MTT results showed that the extracts of arginine - collagen - chitosan scaffolds were more effective in promoting cell proliferation than the extracts of collagen - chitosan scaffolds. Overall, arginine - collagen - chitosan scaffolds were more suitable for skin tissue engineering scaffolds.

4. We transplanted the fibroblasts into the arginine-collagen-chitosan scaffolds and studied the cells' proliferation and biological activity. The results of SEM, DAPI staining, HE staining and Flow cytometry, indicated that fibroblasts had good adhesion and proliferation in the arginine-collagen-chitosan scaffolds. We successfully constructed the dermal substitute *in vitro* with functionally vitality.
5. Based on the dermal substitute, we seeded the keratinocytes onto the dermal substitutes and constructed the bilayered artificial skin by co-culture. The HE staining showed that the keratinocytes grew and proliferated well, and became confluence with some fibroblasts among them after three days of co-culture.

The living artificial skin substitute we constructed had not only good properties of physics and chemistry but also good biocompatibility. It can be used as an artificial skin substitute for the repair of the skin defect.

**Key Words:** Fibroblasts; Keratinocytes; Arginine; Tissue engineering; Skin

# 目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 文献综述 .....	1
1.1 组织工程概述 .....	1
1.2 皮肤的结构和功能 .....	3
1.3 皮肤组织工程学研究的内容 .....	6
1.4 已经商品化的组织工程皮肤 .....	11
1.5 本研究课题的提出和意义 .....	12
第二章 SD 大鼠皮肤角质细胞和成纤维细胞的体外分离培养.....	14
2.1 材料和方法 .....	14
2.2 实验方法 .....	16
2.3 结果 .....	20
2.4 讨论 .....	23
2.5 结论 .....	25
第三章 组织工程支架的制备与表征 .....	26
3.1 实验材料和仪器 .....	27
3.2 实验方法 .....	28
3.3 结果 .....	33
3.4 讨论 .....	44
3.5 结论 .....	48
第四章 组织工程皮肤的制备与研究 .....	49
4.1 实验材料和仪器 .....	49
4.2 实验方法 .....	51
4.3 结果 .....	54
4.4 讨论 .....	61



4.5 结论 .....	64
参 考 文 献 .....	65
全文总结与展望 .....	74
全文总结 .....	74
研究展望 .....	74
发表论文情况 .....	76
致谢 .....	77

## Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter1 Literature review.....</b>	<b>1</b>
1.1 The summary of tissue engineering .....	1
1.2 The structure of human skin .....	3
1.3 Study contents of tissue engineering skin .....	6
1.4 The commercial tissue engineering skin .....	11
1.5 Prospect .....	12
<b>Chapter2 Separation and culture of SD rat's keratinocytes and fibroblasts .....</b>	<b>14</b>
2.1 Materials and apparatus.....	14
2.2 Methods .....	16
2.3 Results.....	20
2.4 Discussion .....	23
2.5 Summary .....	25
<b>Chapter3 Fabrication and property test of the tissue engineering scaffolds .....</b>	<b>26</b>
2.1 Materials and apparatus.....	27
2.2 Methods .....	28
2.3 Results.....	33
2.4 Discussion .....	44
2.5 Summary .....	48
<b>Chapter4 Fabrication and property test of the tissue engineering skin .....</b>	<b>49</b>

2.1 Materials and apparatus.....	49
2.2 Methods .....	51
2.3 Results.....	54
2.4 Discussion .....	61
2.5 Summary .....	64
<b>References .....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusions and prospects.....</b>	<b>74</b>
Main conclusions .....	74
Prospects.....	74
<b>Papers publication .....</b>	<b>76</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>77</b>

## 第一章 文献综述

### 1.1 组织工程概述

#### 1.1.1 组织工程的定义

化学工程师 Langer 教授和哈佛大学医学院的临床医生 Vacanti 正式提出了“组织工程”的概念，并对组织工程进行了如下定义：组织工程是应用生命科学与工程学的原理和方法来设计、组建、维护人体细胞和组织的生长，以恢复受伤的组织或器官的功能<sup>[1]</sup>。

组织工程皮肤是应用组织工程技术将体外培养扩增的大量具有增殖能力的皮肤种子细胞种植在具有生物相容性的生物材料上，在体外持续培养以获得与正常在体皮肤相似的人工皮肤<sup>[2]</sup>。建立与正常人体皮肤结构和功能相近的复合皮肤是组织工程皮肤研究的方向。

#### 1.1.2 组织工程的原理

组织工程的基本原理是首先利用细胞分离技术，获得原代种子细胞，再在体外扩增细胞，将种子细胞与可降解生物材料支架相结合，使细胞贴附在支架材料表面，形成细胞—支架复合物。体外培养一定时间后植入体内，用以修复或替代病损组织和器官，随着生物材料被逐渐降解吸收，种子细胞在体内或体外不断增殖并分泌细胞外基质，通过分泌相关的细胞因子，调节细胞的增殖和分化，最终形成与相应组织、器官形态和功能相一致的组织或器官，从而达到修复病损器官和重建器官的目的<sup>[3]</sup>。

### 1.2 皮肤的结构和功能

#### 1.2.1 皮肤的结构

皮肤是包裹在整个身体外表面的一层被膜状组织，被覆于人体全身表面，与外界环境直接接触，是解剖学和生理学上的重要边界器官。皮肤结构分为表皮、真皮、皮下组织以及一些附属器官，见图 1.1。

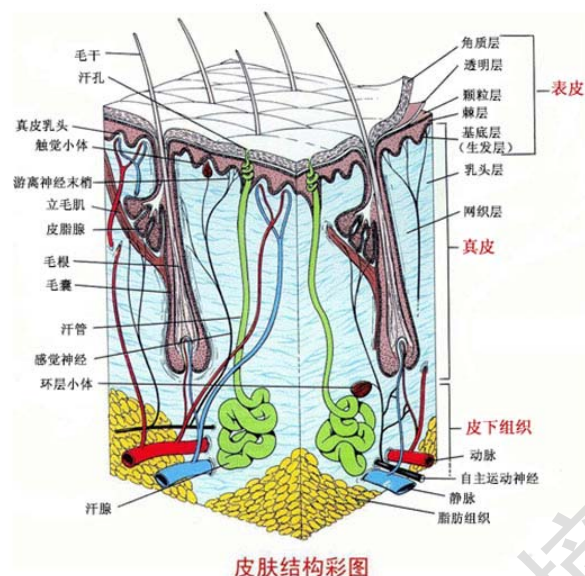


图1.1 人体皮肤的结构

Fig.1.1 The structure of human skin

#### 1.2.1.1 表皮

表皮位于皮肤最外层，表皮由外向内可分为以下5层：角质层、透明层、颗粒层、棘层、基底层<sup>[4]</sup>。在表皮中，角质层、透明层、颗粒层属于高度分化的细胞，增殖能力弱。基底层细胞及近基底层棘细胞才具较强的增殖能力，这是由于表皮干细胞分布在这个位置。

#### 1.2.1.2 真皮

真皮层厚约1-3 mm，属于不规则的致密结缔组织，由纤维细胞、肥大细胞、组织细胞及淋巴细胞等细胞成分及其产生的胶原纤维、弹力纤维、网状纤维与基质等以及神经、血管、淋巴管、肌肉、毛囊、皮脂腺及大小汗腺等组织和器官组成。真皮层是皮肤的“生命源泉”。

#### 1.2.1.3 皮下组织

皮下组织又称皮下脂肪层或脂膜，位于真皮的下部，由脂肪小叶和小叶间隔所组成，其下紧临肌膜。皮下组织的厚薄依年龄、性别、部位及营养状态而异。有防止散热、储备能量和抵御外来机械性冲击的功能。

#### 1.2.1.4 皮肤附属器官

皮肤附属器官包括毛发、毛囊、汗腺、皮脂腺和指(趾)甲等，这些附属器官

对维持人体正常的生命活动起着重要的作用。

### 1.2.2 皮肤的功能

皮肤具有防护、调节体温、感觉、分泌与排泄、呼吸作用、免疫、吸收等生理功能，还参与各种物质代谢，并且是一个重要的免疫器官，使机体维持一个稳定的内环境，更好的适应外环境的各种变化。

## 1.3 皮肤组织工程学研究的内容

组织工程学研究主要涉及到种子细胞、支架材料和组织或器官构建三方面的内容<sup>[5-6]</sup>。

### 1.3.1 皮肤组织工程种子细胞

#### 1.3.1.1 角质细胞

角质形成细胞是皮肤组织工程中表皮重建的主要种子细胞。角质细胞长满时成“铺路石状”，如图 1.2-a 所示。正常角质细胞大部分属于终末分化细胞。培养时，贴壁差，增殖力低，生活力弱，生长条件要求高，传代次数有限<sup>[7]</sup>。

角质细胞最常使用的原代培养方法是酶消化法。Dispase 酶是一种中性蛋白酶，中性蛋白酶主要分解皮肤的 VI 型胶原蛋白和纤维粘连蛋白，只破坏半桥粒结构，分解基底膜成份，并不破坏表皮细胞间的桥粒结构，因而可以得到包括基底层在内的较纯净的表皮层。以 Dipsase 酶分离表皮和真皮，可基本排除成纤维细胞的污染。

目前，角质形成细胞体外培养方法主要有两种：以 3T3 细胞作为滋养层的有血清培养法和无血清培养法。1975 年，Rheinwald 等<sup>[8]</sup>利用 3T3 成纤维细胞作为滋养层体外大规模培养人表皮细胞获得成功，表皮细胞在高钙浓度下培养 3-4 周可以连接成片。近年来发展起来的无血清培养法使得培养过程变得简单且无血清培养可抑制成纤维细胞增殖，促进上皮细胞生长<sup>[9]</sup>。采用无血清培养的一个明显优点是细胞倍增时间缩短，原代细胞接种增殖细胞数量明显高于含血清培养基<sup>[10]</sup>。

1975 年，美国 Rheinwald 和 Green 等首次报告体外培养人表皮角质细胞获得成功。1981 年 Connor 等<sup>[11]</sup>将培养的自体表皮细胞膜片应用于临床，成功封闭了

烧伤患者切痂后创面。Bell<sup>[12]</sup>等先后将新生儿包皮真皮成纤维细胞与牛型胶原制成 ECM，上面覆盖人体表皮细胞制成人工皮肤，证明可为人体创面接受。经过先驱们的努力工作后，培养的角质细胞皮片开始应用于严重烧伤、皮肤生理、病理、表皮基因表达、真表皮连接、创面愈合修复等方面的研究以及临床上其他疾病，特别是慢性静脉曲张性溃疡<sup>[13-14]</sup>。

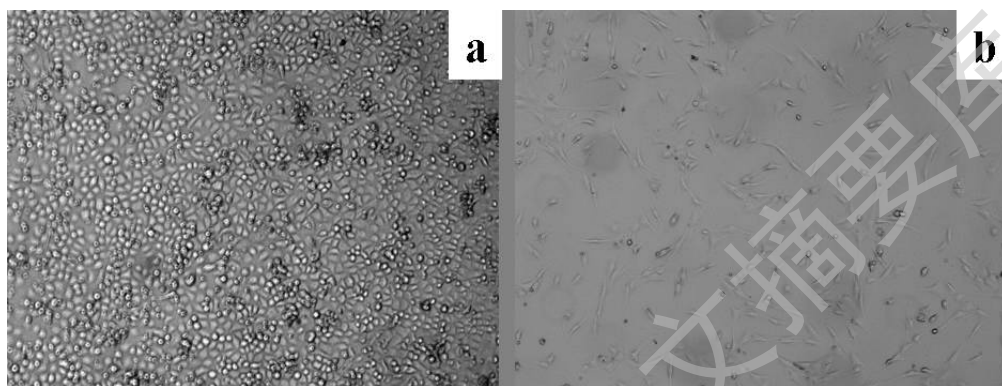


图 1.2 皮肤组织工程种子细胞

(a) 角质细胞; (b) 成纤维细胞

Fig.1.2 Seed cells of skin tissue engineering

(a) Keratinocytes; (b) Fibroblasts

#### 1.3.1.2 成纤维细胞

成纤维细胞是目前皮肤组织工程应用最为广泛的种子细胞。成纤维细胞胞体大，为多突的纺锤形或星形的扁平细胞，细胞核呈规则的卵圆形，如图 1.2-b 所示。成纤维细胞是真皮中最主要的细胞类型，是皮肤组织损伤后的主要修复细胞，具有分泌 I、III 型胶原、相关细胞因子及蛋白酶等功能<sup>[14-17]</sup>。

真皮成纤维细胞的分离培养方法较简单，已经非常成熟，主要有两类方法。一类为组织块培养法，这也是最早的细胞培养方法之一，培养效率不高。另一类为酶消化法，可以用胰蛋白酶或胶原酶消化得到皮肤成纤维细胞。酶消化法一次收获的细胞量大，细胞生长快。

通过成纤维细胞构建的活性真皮替代物，真皮层具有细胞活性比较接近正常状态，成纤维细胞的存在使真皮基质结构更加有序化，并且其分泌的某些细胞因子及基质成分，能够对真皮替代物的表面进行修饰，增强血管内皮细胞的移行能力，进而加快血管化速度，促进表皮细胞黏附生长以及基底膜形成的能力。

Norbury<sup>[18]</sup>等利用胎儿成纤维细胞与马胶原覆盖深度烧伤,发现烧伤创面愈合速度与质量都有明显改善,说明胎儿成纤维细胞可能是适合组织工程的种子细胞。Hansbrough 等<sup>[19-20]</sup>的研究表明在尼龙网上种植新生儿包皮成纤维细胞后,可促进血管侵入生长,并减少对尼龙、硅胶等异物的炎性反应;在 PGL 或 PGA 网上种植自体或异体成纤维细胞,作为真皮替代物的临床应用效果良好。

在组织工程学的发展过程中,种子细胞的选择经历了从单纯的组织细胞到具有多向分化潜能的胚胎干细胞和成体干细胞的过程。组织细胞中,成纤维细胞作为组织工程皮肤的主要种子细胞之一,易于在体外大规模扩增并且不易老化,适于作为构建组织工程真皮的种子细胞。在大多数组织工程皮肤的研究模型中,都构建了含有成纤维细胞的真皮成分。角质形成细胞是皮肤组织工程中表皮重建的主要种子细胞,但是角质细胞属于终末分化细胞,体外传至一定代数后会发生老化,增殖能力也有限。近年来发展起来的无血清培养法,使得培养过程变得简单,且无血清培养可抑制成纤维细胞增殖,促进上皮细胞生长<sup>[9]</sup>,其体外培养技术已广泛应用于皮肤病理学方面的研究。

近年来研制的组织工程皮肤虽然能尽快覆盖创面促进愈合,但因其不能重建毛囊、皮脂腺和汗腺等皮肤附属器官,难以达到完全意义上的功能愈合皮肤。各种种子体外培养模型的建立,将有助于进一步了解各种种子细胞的生物学特点,揭示其功能活性,为构建具有皮肤附属器官的新型组织工程皮肤奠定基础<sup>[21]</sup>。

### 1.3.2 皮肤组织工程用材料

组织工程支架材料不仅应具有天然三维网络多孔结构、可调节的降解性和低免疫原性,还应具有良好生物活性及生物相容性,从而能有效促进细胞增殖和分化,减少创面氧自由基,加快创面愈合。目前,已发现许多可用作皮肤支架材料的生物材料。其中包括大量天然产物和合成高聚物,分别介绍如下。

#### 1.3.2.1 天然生物材料

##### 1.3.2.1.1 胶原

胶原蛋白的基本结构单位是原胶原,原胶原肽链一级结构具有 $(\text{Gly-x-y})_n$ 重复序列,其中 x 常为脯氨酸, y 常为羟脯氨酸或羟赖氨酸。原胶原是由三条  $\alpha$ -肽链组成的纤维状蛋白质,相互拧成三股螺旋状结构,长 300 nm,直径 1.5 nm<sup>[22]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库